

University of Groningen

Leven in een notendop

Kuipers, Oscar

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2001

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Kuipers, O. (2001). *Leven in een notendop: een genomische benadering van bacteriën*. Rijksuniversiteit Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Leven in een notendop: een genomische benadering van bacteriën.

Concept van oratie Oscar Kuipers, Moleculaire Genetica, RUG, dinsdag 3 april 2001, 16.30, Academiegebouw Groningen

Mijnheer de Rector Magnificus,
Dames en Heren,

Inleiding

Bacteriën zijn intrigerende en veelzijdige organismen. Helaas wordt hun rol in ons dagelijks leven vaak niet goed begrepen en gewaardeerd. Dat wist de Turkse groenteman uit een van de programma's van Koot en Bie ook al, toen een Hagenese klant vroeg om fruit en groenteproducten met kleine gezonde bestjes erin, daarmee op de vitaminen doelend. Maar is er eigenlijk zoveel verschil tussen de gezonde stoffen in menig voedselproduct en het voorkomen van eveneens onzichtbare bacteriën in bepaalde gefermenteerde voeding? Ook hier dragen de bacteriën bij aan de voedingswaarde, smaak, consistentie en de aanwezigheid van vitaminen en mineralen, eigenschappen die we zo goed kennen uit de reclame. De klassieke biotechnologie maakt hiervan reeds lang gebruik door uit de vrije natuur geïsoleerde bacteriën toe te passen voor de bereiding van producten als kaas, yoghurt, olijven en zuurkool.

Bacteriën en genetica.

Binnen de leeropdracht Moleculaire Genetica van Prokaryoten, houd ik me bezig met de bestudering van bacteriën met behulp van genetische en moleculair biologische technieken. In deze oratie zal ik trachten aan te geven wat de wetenschappelijke doelen van dit onderzoek zijn, welke aanpak gekozen werd en wordt, wat het maatschappelijk belang van dit werk is, maar vooral ook waarom bacteriën zo uitermate geschikt zijn als model om levensprocessen van bacterie tot mens te onderzoeken en te begrijpen. Tevens zal ik een blik vooruit werpen om een perspectief te schetsen van te verwachten ontwikkelingen en inzichten op dit gebied.

Bacteriën zijn de simpelste vorm van leven. Het zijn relatief kleine eencellige organismen met een lengte van ongeveer 1/1000ste mm hoewel er ook soorten van meer dan 1 mm groot gevonden zijn. Sommige zijn ook erg beweeglijk. ### Ze komen voor in een enorme variëteit. Een voorzichtige schatting is dat er 10.000den soorten bacteriën voorkomen in de vrije natuur. Bacteriën spelen een grote rol in het leven van de mens, zowel in positief als in negatief opzicht. Als positief kan genoemd worden de rol van bacteriën als modelsysteem in moleculair biologisch onderzoek, waarvoor ze uitermate geschikt zijn, door hun vaak snelle groei op simpele voedingsbronnen en het gemak van genetische modificatie bij een aantal soorten. Ook hun rol in het afbreken van verontreinigingen in het milieu, hun rol in de productie van voor de mens belangrijke stoffen, waaronder ook farmaceutische verbindingen als vitaminen en antibiotica, en hun rol in de productie van gefermenteerde voedingsmiddelen is aanzienlijk. In al deze toepassingen speelt de biotechnologie een belangrijke rol, zowel door middel van de directe toepassing als ook door de genetische modificatie van deze organismen om hun eigenschappen te verbeteren. Bacteriën zijn ook onmisbaar als onderdeel van de darmflora, waar ze helpen in de spijsvertering en in de afweer tegen ongewenste organismen.

Tegenwoordig worden verscheidene ‘goede’ bacteriesoorten gezien als een natuurlijk ingrediënt in bepaalde producten en kunnen ze een waardevolle bijdrage leveren aan het behouden van een goede gezondheid. Als er moedwillig levende bacteriën worden gebruikt in voedselfermentaties of in zuiveldrankjes om de gezondheid te bevorderen spreekt men van probiotica. Helaas worden de gezondheidsclaims die aan deze producten verbonden zijn lang niet altijd ondersteund door gedegen wetenschappelijk bewijs, hoewel serieus onderzoek aan deze zaken nu wel toeneemt. Dit zal waarschijnlijk in de toekomst leiden tot nieuwe voedingsmiddelen met specifieke en bewezen gezondheidsbevorderende eigenschappen.

In negatieve zin kennen we bacteriën als ziekteverwekkers. Bekende voorbeelden zijn de tuberculose bacterie, *Mycobacterium tuberculosis*, de pneumococ *Streptococcus pneumoniae*, de *Legionella* bacterie, bekend van de recente uitbraken, en de maagzweer bacterie *Helicobacter pylori*. Het bestrijden van infectieziekten is nog steeds van mondiaal belang en het verweer van bacteriën door resistent te worden tegen door de mens aangewende antibiotica vormt in toenemende mate een probleem. Een andere groep ongewenste bacteriën bestaat uit de voedselpathogenen zoals *Listeria monocytogenes*, die enige jaren terug in bepaalde niet goed bewerkte Franse kaasjes werd aangetroffen en diverse consumenten het leven heeft gekost. Een beter begrip van de essentiële

levensprocessen in een bacterie is dan ook van groot belang om nieuwe middelen te kunnen ontwikkelen om deze ziekteverwekkers te kunnen bestrijden.

Bacteriën zijn ook om een aantal andere redenen zeer bijzonder. Het was de eerste levensvorm die op aarde verscheen, zo'n 4 miljard jaar geleden. Ter vergelijking, de eerste dieren ontstonden 1 miljard jaar geleden, terwijl de mens pas enkele miljoenen jaren geleden ontstond. Met dat gegeven in gedachten is het zeer interessant dat onlangs in 250 miljoen jaar oude zoutkristallen sporen van bacteriën van de *Bacillus* familie gevonden zijn, die weer tot leven gewekt konden worden in het laboratorium (Vreeland et al., 2000). Dit soort vondsten biedt ongekennde mogelijkheden voor evolutionair onderzoek en illustreert het extreme uithoudingsvermogen van bacteriën. Nog verder terug in de historie gaan de recente berichten dat er tekenen van bacterieel leven op Mars zijn gevonden, de eerste experimentele aanwijzingen voor leven op een andere planeet. In een meteoriet gevonden op Antarctica werden microscopisch kleine magnetietkristallen gevonden die op aarde uitsluitend door een bepaalde bacterie kunnen worden gemaakt (Thomas-Keprta et al., 2001). Dit zou kunnen betekenen dat er 170 miljoen jaar geleden nog leven op Mars voorkwam.

Laten we nu eens kijken hoe bacteriën er uit zien en hoe ze opgebouwd zijn. #### Een bacterie in zijn elementairste vorm bestaat uit een groot DNA molecuul, veelal op een circulair chromosoom gelegen, een celsap met eiwitten, mineralen en een aantal organische en anorganische verbindingen die ofwel als bouwsteen ofwel als cofactor dienen, omgeven door een celenveloppe, bestaande uit een of twee celmembranen opgebouwd uit vetachtige verbindingen en een suiker-eiwit laagje, de celwand. We onderscheiden Gram-negatieve bacteriën, die een dubbele celmembraan bezitten, zoals *Escherichia coli* en *Salmonella*, en Gram-positieve bacteriën, die slechts een enkele membraan bezitten. Mijn onderzoek richt zich vooral op de Gram-positieve bacteriën, in het bijzonder op de zuivelbacterie *Lactococcus lactis* en het biotechnologische werkpaard *Bacillus subtilis*. Het genetisch onderzoek aan bacteriën kan zeer ruim opgevat worden, maar altijd vindt er op een of andere manier een handeling met DNA plaats. Dit is niet verwonderlijk omdat op het DNA de erfelijke eigenschappen van een organisme, in de vorm van genen, gecodeerd liggen. Een van de basisprincipes in de moleculaire biologie is immers dat de genen, dat zijn er enkele duizenden in een bacterie, worden overgeschreven in RNA en dat het RNA vervolgens vertaald wordt in eiwit, een lange op een specifieke wijze opgevouwen keten aminozuren. De eiwitten zorgen voor functionele activiteiten in de cel door als enzym of bouwsteen te fungeren. Genetisch onderzoek

maakt het mogelijk om elementaire cellulaire processen te bestuderen, zoals vermenigvuldiging van DNA, het produceren van RNA en eiwit, het opbouwen van structuren zoals de membraan en de celwand, en het verwerken van voedingsstoffen zoals suikers en stikstofbronnen. Transport processen van binnen naar buiten en andersom zijn ook zeer belangrijk. Al deze processen vinden tegelijkertijd plaats in een cel en moeten daarom perfect op elkaar afgestemd zijn. Om dit te bereiken zorgt de cel ervoor dat niet op alle tijdstippen evenveel RNA en eiwit gemaakt wordt; hij past zich dus aan de omstandigheden aan. Het mechanisme dat ten grondslag ligt aan dit fenomeen heet genregulatie en dit vormt een van de kernthema's van het onderzoek in de Moleculaire Genetica groep.

Bacteriën vormen een zeer goed modelsysteem om deze processen te bestuderen omdat vele soorten zich snel kunnen vermenigvuldigen. Typische delingstijden van modelorganismen liggen tussen de 20 minuten en een uur.### Dit betekent dat een enkele bacterie in een nacht kan uitgroeien tot een zichtbare kolonie op een voedingsbodem of tot een vloeibare culture met miljarden identieke soortgenoten. Daardoor hebben we elke ochtend de beschikking over vers materiaal om DNA, RNA, eiwit of celwand uit te isoleren, er gedurende de dag verder mee te werken en aan het eind van de dag een nieuw experiment in te zetten. Het ritme van onderzoek sluit dus ook mooi aan bij ons eigen dag-nacht ritme.

Onderzoeksvragen

Ik wil u nu enkele voorbeelden laten zien van lopend onderzoek, zowel met een fundamenteel karakter als met een biotechnologische, dus toepassingsgerichte focus. Laat ik beginnen met *Lactococcus lactis*, de best bestudeerde melkzuurbacterie. Deze soort wordt al duizenden jaren gebruikt in zuivelfermentaties, waarvan een van de belangrijkste het kaasmaken is. *Lactococcus* vervult in het kaasbereidingsproces een veelzijdige rol: hij zorgt samen met het stremsel voor afbraak van melkeiwitten, waardoor hij bijdraagt aan smaak-aroma ontwikkeling en consistentie van het eindproduct. Ook verzuurt hij de melk waardoor de houdbaarheid van het eindproduct kaas toeneemt. Op moleculair niveau wordt de rol van lactococci in deze processen al meer dan 15 jaar met veel succes in ons laboratorium bestudeerd onder de dagelijkse leiding van Dr. Jan Kok. Een heel aantrekkelijke eigenschap van sommige lactococci is de productie van natuurlijke conserveermiddelen, zoals het anti-microbiële peptide nisine dat reeds op beperkte schaal toegepast wordt. Nisine werkt effectief tegen Gram-positieve pathogene- en bederfbacteriën, door de membraan van de te bestrijden bacterie te doorboren. Het mechanisme

van deze werking is onlangs verder opgehelderd, waardoor duidelijk werd dat niet alleen de membraanfosfolipen maar ook een celwand-precursor molecuul, het lipid II, een belangrijke rol vervullen bij de herkenning en membraaninsertie van nisine, waardoor afdoding van de schadelijke bacterie plaatsvindt (Breukink et al., 1999). Heel interessant hierbij is dat lipid II ook een belangrijk molecuul is als aangrijpingspunt van sommige klassieke antibiotica zoals vancomycine, dat vaak als laatste redmiddel gezien wordt in de strijd tegen antibiotica-resistente ziekenhuis-bacteriën ~~###~~krantAZG. Helaas worden nu ook vancomycine-resistente bacteriën steeds vaker aangetroffen, hetgeen de noodzaak van het vinden van nieuwe effectieve antimicrobiële middelen sterk vergroot. Wellicht dat van nisine afgeleide moleculen een rol in de ontwikkeling van nieuwe antibiotica zullen kunnen vervullen, zonder het gebruik van nisine zelf als veilig conserveermiddel van voeding in de weg te staan. Zeer interessant in deze context is ook dat onlangs in onze groep nieuwe bacteriocines gevonden zijn, die uitgescheiden worden met behulp van een eiwit dat ook verantwoordelijk is voor multi-drugresistentie in mens en bacterie. Er zijn aanwijzingen dat deze klasse bacteriocines daardoor de drugresistentie van bacteriën en mogelijk zelfs van menselijke kankercellen kunnen tegengaan, waardoor schadelijke bacteriën beter bestreden kunnen worden en kankercellen beter te behandelen zouden zijn.

De lactococ maakt van nature ook enzymen die in bepaalde levensstadia voor afbraak van celwanden zorgen, de zogenaamde autolysines. Deze enzymen hebben de bijzondere eigenschap dat ze een domein bezitten dat een grote affiniteit voor celwanden bezit, waardoor ze als het ware als een anker kunnen dienen om eiwitfragmenten naar keuze te kunnen binden aan een groot scala van andere bacteriën. Hiervan kan in de biotechnologie goed gebruik gemaakt worden en momenteel wordt in nauwe samenwerking met het bedrijf BioMaDe onderzocht of deze celwandankers bruikbaar zijn voor vaccintoediening of voor andere nu nog niet openbaar te maken toepassingen. Het is per slot van rekening een bedrijf dat het mede van patenten moet hebben. Recentelijk is een project gestart op genoomsequentiebepalings van *L. lactis* MG1363, een samenwerking van een groep uit Cork, een groep uit Norwich en onze groep. We verwachten dat dit een enorme versnelling van ons moleculair genetisch en biotechnologisch onderzoek zal geven, maar daarover straks meer.

Het andere modelorganisme in onze groep is de wereldwijd veelvuldig bestudeerde bacterie *Bacillus subtilis*, een vermaard modelsysteem en daarbovenop werkpaard voor de biotechnologie, die normaal in de grond voorkomt. Deze Gram-positieve bacterie heeft zekere overeenkomsten met Lactococcen, zoals een relatief hoog gehalte aan adenine en thymine basen in zijn DNA, maar ook veel verschillen. Zo kan

Bacillus zeer efficiënt eiwitten uitscheiden, kan zelf DNA opnemen uit het medium, kan sporen maken en heeft een groot natuurlijk aanpassingsvermogen aan veranderende omstandigheden. Het is dan ook niet verwonderlijk dat het DNA molecuul van *Bacillus subtilis*, zijn genoom, bijna tweemaal zo groot is als dat van de lactococ. In onze groep vind onder leiding van Dr. Sierd Bron, reeds lange tijd onderzoek plaats aan de mechanismen van eiwitsecretie en genregulatie in *Bacillus*. Veel van dit werk vindt plaats in Europese samenwerkingsverbanden, onder de zogenaamde BACELL paraplu. Deze samenwerkingsverbanden hebben in 1997 geleid tot de publicatie van de gehele *Bacillus subtilis* genoomsequentie en tot een verheugde belangstelling voor *Bacillus subtilis* als modelsysteem voor het bestuderen van elementaire cellulaire processen. Een goed begrip van de secretie van eiwitten is noodzakelijk om een hogere productie van industrieel belangrijke eiwitten, zoals enzymen voor de wasmiddelen- of papierproductie, of eiwitfragmenten als onderdeel van een vaccin, te kunnen verkrijgen. De eiwitsecretie is een uiterst complex proces, dat voor de cel ook behoorlijk stressvol kan zijn. Er zijn dan ook meerdere secretieroutes en vormen van stress relevant bij het proces. Sommige van de genen die bij deze processen betrokken zijn behoren tot de FUN-genen (Function UNknown), hetgeen hun bestudering niet alleen noodzakelijk maar ook aangenaam maakt. Hoewel er al veel bekend is van eiwitsecretie, doemen telkens nieuwe onderzoeksvragen op en de verwachting is dat dit de komende jaren zal leiden tot een vergaand geïntegreerd inzicht in dit belangrijke proces.

Genomics

Een beperkt aantal voorbeelden van onderzoeksgebieden waar bacteriële genetica een belangrijke rol speelt is nu de revue gepasseerd. Aan deze onderwerpen wordt al decennia-lang wereldwijd door een groot aantal groepen gewerkt. Wat opvalt is het feit dat het onderzoek zich veelal toespitst op het ophelderen van een of meerdere gekoppelde processen in een cel, terwijl we toch eigenlijk het liefst de samenhang tussen alle voor cellulair leven belangrijke processen zouden willen doorgronden.

De tijd is aangebroken dat dit daadwerkelijk mogelijk wordt en wel door de revolutie genaamd 'genomics', die zich nu binnen de levenswetenschappen in snel tempo aan het voltrekken is. Genomics kan omschreven worden als een onderzoeksmethode die gebruik maakt van een scala aan ongekend krachtige onderzoeksgereedschappen om de activiteit en functie van alle genen en eiwitten in een levende cel simultaan en in samenhang te kunnen bestuderen.

Deze ontwikkeling is allereerst mogelijk gemaakt door de ontwikkeling van zeer snelle methoden om de volgorde van DNA van welk organisme dan ook te bepalen. Zo'n 10

jaar geleden werd het nog als een bijzondere prestatie beschouwd als een laboratorium erin slaagde om de volgorde van enkele honderdduizenden basenparen te bepalen, een activiteit die vaak meer dan een jaar in beslag nam. Een mooi voorbeeld is de sequentiebepaling van de industrieel belangrijke bacterie *Bacillus subtilis* uitgevoerd door een groot consortium van Europese en Japanse groepen, waaronder ook die van Sierd Bron en Gerard Venema. Na ongeveer 5 jaar werd een volledig geannoteerde 4.1 Mbp sequentie gepubliceerd in Nature, toentertijd een geweldige prestatie (Kunst et al., 1997). Nu worden er op diverse plekken in de wereld, zoals bij het Sanger Centre bij Cambridge, per dag zo'n 50 miljoen basenparen gesequenced, een capaciteitsversnelling van minimaal een factor 1000. Ter vergelijking: het ruwe sequencen van een bacterieel genoom kan nu binnen een dag door een persoon gedaan worden, terwijl het aan elkaar zetten van de fragmenten en de toekenning van veronderstelde functies door specialisten in enkele weken kan plaatsvinden. Deze snelle vooruitgang is enigszins te vergelijken met de ontwikkeling die zich in de computerbranche heeft voorgedaan, waarbij in de begintachtiger jaren de Commodore 64 (kb) een begeerd artikel was en we nu toch liefst minimaal 256 Mb intern geheugen en enkele tientallen Gigabytes opslagcapaciteit tot onze beschikking wensen te hebben. Het zogenaamde 'sequencen' van DNA van een grote verscheidenheid aan organismen, waaronder tientallen bacteriën, enkele gisten en schimmels, archaea, planten, een wormpje, de fruitvlieg en onlangs in februari dit jaar als klap op de vuurpijl ook de mens, heeft een enorme invloed op het toekomstig onderzoek, hoewel er nog geen tien jaar terug door sommige onderzoekers met enige scepsis gereageerd werd op de bedrijvigheid op dit gebied. Waarom is het in handen hebben van DNA sequenties van levende organismen zo belangrijk? Allereerst geeft het ons de genetische blauwdruk van het organisme. Als we de DNA-volgorde kennen, kunnen we op zoek gaan naar alle genen die gecodeerd liggen op het DNA. We weten sinds kort dat op het humane genoom van 3 miljard basenparen er rond de 30.000 genen liggen. Dat betekent dat er gemiddeld slechts 1 gen per 100.000 bp ligt, een dichtheid van 1-10%. In een gemiddeld bacterieel genoom van zo'n 3 miljoen basenparen liggen typisch zo'n 3000 genen, hetgeen een dichtheid van 1 gen per 1000 bp betekent, 50-95% dichtheid. In deze zin springen bacteriën dus een stuk efficiënter met hun (DNA) geheugenruimte om dan de mens. Het lijkt wellicht eenvoudig om in een DNA sequentie alle potentiële genen op te sporen, maar dat is het zeker niet. Gebruikmakend van een aantal regels in de moleculaire biologie kan men stukken DNA aanwijzen waar zich zogenaamde open reading frames bevinden. Ik beperk me nu even tot het relatief eenvoudige geval van de bacterie. De open leesramen, relatief lange stukken DNA die potentieel coderen voor eiwitten, moeten nader bekeken worden op een aantal karakteristieken, zoals op de

aanwezigheid van eventuele promoter- en terminator sequenties, translatiestartsignalen, en vooral ook op homologie met eiwitten die reeds in voorgaande studies in andere organismen bepaald zijn, en liefst ook biochemisch en functioneel gekarakteriseerd zijn. Om deze toekenning van genen en de door hun gecodeerde eiwitten te kunnen doen, is de computer onmisbaar, en het gebied van de bioinformatica is dan ook uitermate belangrijk geworden in het genoomonderzoek. Als eenmaal zo goed mogelijk in kaart gebracht is waar zich welke genen bevinden, en er voor zover mogelijk ook functies aan deze genen zijn toegekend, wat voor een bacterie voor zo'n 60 à 70% van de genen momenteel lukt, is het basisoverzicht van het genoom klaar voor gebruik.

Een tweede zeer belangrijke technologische ontwikkeling is die van de experimentele genomics. Hierbij moeten we denken aan DNA-chips of DNA-microarrays, om de mate van expressie van elk gen in het genoom te kunnen bepalen, het zogenoemde transcriptoom, waarmee we een totaal overzicht proberen te krijgen van alle actieve genen op een bepaald tijdstip onder een bepaalde omstandigheid. Ook het kunnen bepalen van de hoeveelheid van elke eiwitsoort in een cel onder de voornoemde specifieke condities, het proteoom, behoort nu tot de mogelijkheden. Deze methoden hebben gemeenschappelijk dat ze een hoge graad van automatisatie en miniaturisatie hebben, de totale celinhoud analyseren en daardoor informatie over de belangrijke biomoleculen mRNA en eiwit in een cel tegelijkertijd genereren. Ze hebben tevens gemeenschappelijk dat het benodigde instrumentarium kostbaar en snel aan verandering onderhevig is. Zeer belangrijk is ook de rol van de bioinformatica, die de complexe datastromen moet helpen verwerken en tot zinvolle resultaten en conclusies moet omvormen. Ook methoden voor het in snel tempo bepalen van driedimensionale structuren van biomoleculen, vooral eiwitten, worden steeds krachtiger, een gebied ook wel aangeduid met de term 'structural genomics'.

Ik wil nu wat dieper ingaan op de transcriptoom analyse, die tot doel heeft de activiteit, d.w.z. de expressieniveaus, van elk gen onder een bepaalde omstandigheid en op een bepaald tijdstip, te kunnen bepalen en vergelijken met de niveaus in een referentiecel. Waarom willen we dat weten? In de eerste plaats om de veranderingen die plaatsvinden in de cel, te kunnen bepalen als respons op veranderende omstandigheden of op het uitschakelen van een bepaald gen. Als we dit nauwkeurig in kaart kunnen brengen voor een groot aantal omstandigheden ontstaat een overzicht van de complexe regulatoire netwerken die een rol spelen bij het aanpassingsvermogen van een bacterie. En als we dat weten kunnen we het groeigedrag van de bacterie onder bepaalde omstandigheden proberen te voorspellen, bijvoorbeeld met simulatiemodellen. Hoe werken nu deze DNA-microarrays? Op een glasplaatje ter grootte van een objectglasje, zoals we dat kennen

uit de microscopie, wordt een stukje DNA van elk gen uit het genoom met een soort ink-jet printer, de zogenaamde arrayer, opgebracht. Daardoor ontstaat een patroon, bestaande uit duizenden minuscule DNA-stipjes per vierkante centimeter, dat alle genen van het genoom representeert. Door gebruik te maken van een beproefd principe in de moleculaire biologie namelijk de DNA-DNA hybridisatie, kunnen we de relatieve hoeveelheid messengerRNA, gevormd door overschrijven van elk gen, bepalen met een confocal laser-scanner. Hiertoe, vindt eerst omzetting van mRNA in rood, danwel groen-fluorescent gelabeld DNA plaats bij twee bacteriestammen, die we willen vergelijken. We weten nu dus voor ieder gen of het meer of minder is afgeschreven in de cultuur die we op een bepaalde manier behandeld hebben. En daaruit kunnen we weer destilleren welke genen omhoog en omlaag gereguleerd worden door de opgelegde omstandigheid. Als we dit nu voor een groot aantal omstandigheden herhalen en ook bacteriën onderzoeken die moedwillig beschadigd zijn op bepaalde genen, kunnen we een beeld opbouwen van de regulatieroutes en dat is een belangrijke stap voorwaarts bij het begrijpen hoe cellulaire processen samenhangen. Immers, uit de analyse van de genen in het genoom konden we al voor een groot deel de afbraak en opbouwroutes bepalen, en nu zien we hoe deze samenhangen. Het is echter niet voldoende inzicht te hebben in de expressieniveaus van de genen, we willen ook de hoeveelheden van elk eiwit in de cel kunnen bepalen. De eiwitten bepalen per slot van rekening welke reacties er in de cel uitgevoerd worden. Hiervoor is een groot scala aan analysemethoden ontwikkeld, verzameld onder de naam proteomics. Hiertoe behoren de tweedimensionale gelelectroforese gekoppeld aan massaspectrometrische analyse en sinds kort ook de eiwit- of antilichaamchips, die op een analoge manier informatie geven als de DNA-arrays ###. Met deze zeer krachtige gereedschappen in handen kunnen we een begin maken met het in kaart brengen van alle voor het leven belangrijke processen in hun samenhang. Hiervoor is het echter wel van groot belang dat we de stortvloed aan gegevens op de juiste wijze kunnen duiden en daarvoor is de bioinformatica onontbeerlijk. Het opbouwen en koppelen van databases, patroonherkenning binnen complexe gegevensbestanden en visualisatie van resultaten zijn een aantal gebieden die daarbij grote aandacht behoeven.

Welke vragen kunnen we nu gaan beantwoorden, die we zonder dit genenoverzicht en de nieuwe genomics technologie, inclusief bioinformatica niet zouden kunnen beantwoorden?

Voorbeelden van bacteriële genomics-onderzoek

Ook bacteriën onderhouden netwerken. Om te zorgen dat de cellulaire processen op elk moment en onder elke omstandigheid precies op elkaar afgestemd zijn, iets wat in elke levende cel van groot belang is, wordt het actief worden van genen zeer strikt gereguleerd. Een mooi voorbeeld hiervan is het natuurlijke vermogen van *Bacillus subtilis* om DNA uit de omgeving op te nemen, competentie genaamd. *Bacillus* kan dit alleen in uitzonderlijke omstandigheden, in een bepaald stadium van de groei en bij afwezigheid van bepaalde voedingsstoffen. Recent genomics onderzoek van Dr. Hamoen in onze groep heeft aangetoond dat er waarschijnlijk meer dan 100 genen direct of indirect bij competentieontwikkeling betrokken zijn, waarvan een aantal een directe regulatoire rol hebben. Het is zelfs nog ingewikkelder. In een culture van bacterie cellen met elk een identiek genoom, vindt toch differentiatie plaats, m.a.w. niet alle cellen gedragen zich op dezelfde manier, alweer een overeenkomst met de mens. De oorzaak van deze heterogeniteit wordt momenteel onder meer met DNA-arrays onderzocht, maar het is al duidelijk dat ook hier genregulatie en cel-celcommunicatie van cruciaal belang is.

Een andere toepassing van genomics bestaat bij de zoektocht naar nieuwe medicijnen tegen bijvoorbeeld pathogene bacteriën. In de eerste plaats kan het opsporen van essentiële genen in pathogene bacteriën leiden tot de ontwikkeling van stoffen die zo'n essentieel gen platleggen zodat de bacterie niet meer kan groeien. Een probleem is dat bacteriën vroeg of laat resistent worden. Met DNA-arrays kun je nu veel sneller dan vroeger precies zien welke maatregelen de ziekteverwekker neemt om zijn lot te ontlopen. En als we dat weten kunnen we daar weer maatregelen tegen treffen. Het komt dan bijvoorbeeld neer op de toediening van een cocktail aan werkzame stoffen, bijvoorbeeld klassieke antibiotica en van bacteriocines afgeleide stoffen. Een andere interessante ontwikkeling mogelijk gemaakt door genomics is het nauwkeurig kunnen vergelijken van industriële eigenschappen van verschillende verwante bacteriën. Daardoor kunnen bepaalde gunstige eigenschappen gerelateerd worden aan de expressie van bepaalde genen, en kan die combinatie aan genen dan ofwel in de natuur gezocht worden, of via recombinant DNA geconstrueerd worden.

Er is ook een punt van zorg in de moderne biotechnologie en dat betreft de onduidelijkheden die er zijn over de risico's van het gebruik van genetisch gemodificeerde organismen in voeding. We kennen allemaal de verhalen in de krant over de gemodificeerde soja, maïs en tomaten. Terecht wordt erop gewezen dat er behalve voordelen ook nadelen aan deze productiemethode kunnen kleven. Te denken valt aan

effecten op biodiversiteit, gebruik van bepaalde bestrijdingsmiddelen en het gebruik van antibiotica resistentiemarkers. Ook kan niet altijd vastgesteld worden of er neveneffecten van de modificatie kunnen optreden, waardoor wellicht minder wenselijke verbindingen gevormd zouden kunnen worden in het product. Echter, deze problemen zijn grotendeels oplosbaar door a) het vermijden van ongewenste eigenschappen zoals antibioticaresistenties bij het maken van de GGO's, b) een goede wetenschappelijke risico-inventarisatie en -evaluatie van de verspreiding van de modificatie in de natuur en van de zijeffecten van de modificaties en c) goede, onpartijdige consumentenvoorlichting,. Ook hier kan genomics uitkomst bieden als krachtig analysegereedschap. Als we bijvoorbeeld in industrieel gebruikte bacterien met behulp van DNA-arrays de expressieniveaus van alle genen bepalen, dan ontstaat daaruit een beeld van alle natuurlijke niveaus van genexpressie. Nemen we nu een GGO, en bekijken daarvan alle expressieniveaus, dan kunnen we precies vaststellen welke genen een afwijkend niveau bereiken, en vervolgens specifiek bepalen of dit mogelijkwerijs een risico voor onze gezondheid oplevert. Dit is dan een eerste concrete analysetechniek die het mogelijk maakt mogelijke risico's van GGO gebruik in te schatten. We moeten ons overigens ook realiseren dat alle organismen verkregen door klassieke veredeling, die reeds sinds jaar en dag worden toegepast, als ze op dezelfde wijze geanalyseerd worden, een veel groter aantal afwijkende genexpressies te zien zal geven. Wellicht dat deze overweging enige onberedeneerde angst voor het gebruik van GGO's kan wegnemen.

Ik wil het overzicht van genomics perspectieven besluiten met een visie op het fundamenteel genetisch en cellulair onderzoek. Een van de belangrijkste doelen die we ons kunnen stellen is het zo volledig mogelijk kunnen begrijpen hoe alle cellulaire processen werken, samenhangen en gereguleerd worden. Als we dat weten kunnen we een levende cel op de computer simuleren en een begin maken met '*in silico*' experimenten. De computer als laboratorium. Om hiermee een begin te kunnen maken is het nuttig om eerst alle essentiële genen, en hun genproducten te kennen. Er zijn verschillende manieren om dat te benaderen, maar een hele sterke is om met de simpelste organismen te beginnen: die met de kleinste genomen. Het is niet verwonderlijk dat juist de pathogene kleine genomen bezitten omdat ze voor bepaalde functies zwaar op hun gastheer leunen. Een recente analyse van de genomen van *Mycoplasma genitalium* en *Mycoplasma pneumoniae* toont dat deze organismen slechts beschikken over respectievelijk 480 en 685 genen (Peterson en Fraser, 2001). Zelfs deze genen zijn niet allemaal essentieel, onder bepaalde omstandigheden. Er kon aangetoond worden door mutatieanalyse en door genoomvergelijkingen dat er een minimale set van ongeveer 250

genen is, die zeer basale functies in het leven van alle organismen vervullen. Hierbij moet gedacht worden aan replicatie van DNA, transcriptie, translatie, energie productie, transportprocessen, membraan- en celwandbiosynthese en homeostase. In dit opzicht vormt deze basis-set het leven in een notendop en bestaat de uitdaging om organismen met deze basisset te simuleren door de architecturen van hun transcriptoom en metaboolom af te leiden uit de inzichten verkregen bij werkelijk levende . Met deze aanpak wordt een eerste stap gezet naar de volledige simulatie van cellulair leven, die steeds verder uitgebouwd kan worden door modules komend uit genomics onderzoek van en hogere organismen, tot de mens aan toe, in te bouwen. Hiertoe is echter nog een lange weg te gaan omdat informatie komend uit functioneel en structureel genomics onderzoek verwerkt en gekoppeld moet worden, en er ook nog steeds de grote uitdaging bestaat van het oplossen van de functie van FUN genen, waardoor elementaire levensprocessen verder ontrafeld kunnen worden. Van bacterie tot mens. Dit lijkt een grote sprong en dat is het ook. Toch zijn er opvallende verbanden. De publicaties van het humane genoom laten zien dat er meer dan 220 genen in voorkomen die sterke gelijkenis vertonen met bacteriële genen. Toch komen deze weer niet voor in tussenliggende soorten zoals de bakkersgist, de fruitvlieg of de worm. Of deze genen in de mens gekomen zijn door directe overdracht vanuit de bacterie naar bepaalde vertebraten, onze voorouders, is op dit moment onderwerp van een felle discussie. Het zou namelijk de indruk kunnen wekken dat genoverdracht van bacterie naar mens inderdaad direct kan plaatsvinden, een visie die fel bestreden wordt door diverse onderzoekers. Dit voorbeeld laat zien dat genomics een soortoverschrijdend karakter heeft waardoor wederzijds op zinvolle wijze informatie uitgewisseld kan worden tussen de eenvoudigste en meest complexe organismen.

Genomics en bioinformatica in Groningen

Overal in de wereld en dus ook aan de Nederlandse universiteiten en in het bedrijfsleven gonst het van activiteit op genomics gebied. Zwaartepunten van onderzoeksthema's en technologie worden gevormd en de politiek en wetenschapsstichtingen betuigen concrete steun en starten stimuleringsprogramma's. Ook in Groningen is op dit moment grote interesse en activiteit in genomics. Het besef dat deze technologie enorme kansen biedt in een zeer breed onderzoeksgebied, van bacterie tot mens, heeft geleid tot een aantal gezamenlijke acties van de Faculteit Wiskunde en Natuurwetenschappen, de Medische Faculteit en het Academisch Ziekenhuis Groningen. Noodzaak tot samenwerking bestaat omdat de benodigde investeringen in Genomics technologie relatief hoog zijn, men moet denken in termen van miljoenen guldens alleen al voor apparatuur, de technologische ontwikkelingen zeer snel gaan en de expertise op de verschillende deelgebieden, zoals

genoomanalyse en -vergelijking, transcriptoomanalyse, proteoomanalyse, metaboolanalyse, mutatieanalyse, en de verbindende bioinformatica lastig in één basiseenheid zijn in te bedden. Eerste acties hebben geleid tot de oprichting van het Groningen Genomics Centre. Het GGC is een tot nu toe virtueel instituut met als doel optimale faciliteiten en service te bieden op alle voor Genomics relevante gebieden, zowel voor universiteiten als ook voor het bedrijfsleven. Een aantal initiële speerpunten wordt gevormd door Clinical Genomics en door Microbial Genomics, twee gebieden waarin de Groningse Universiteit reeds een uitgebreide expertise heeft opgebouwd en die goed aansluiten bij de industriële bedrijvigheid en de gezondheidszorg in het Noorden. Een zeer belangrijke ondersteuning voor dit Genomics Center vormt de oprichting van een Bioinformatica Centrum bij de Wiskunde en Informatica. Een nieuwe hoogleraar wordt gezocht, die zowel onderwijs als onderzoek in de bioinformatica gaat vormgeven als ook een service taak gaat coördineren voor gebruikers binnen de verschillende Faculteiten. Misschien wel het allerbelangrijkst is dat deze constructies ervoor kunnen zorgen dat ook het onderwijs in Genomics en Bioinformatica op een goede manier gestalte krijgt aan de RUG, omdat er grote behoefte is aan goed opgeleide onderzoekers in deze twee relatief nieuwe vakgebieden. De eerste tekenen duiden er reeds op dat deze nieuwe richtingen in de levenswetenschappen een grote aantrekkingskracht op studenten hebben, wellicht door het multidisciplinaire karakter van dit gebied, de goede werkgelegenheid vooruitzichten, maar waarschijnlijk vooral door de gelegenheid te kunnen werken aan vraagstukken die nog maar kort geleden voor onoplosbaar of te hoog gegrepen doorgingen. Een toegevoegde algemene variantopleiding in de levenswetenschappen zoals nu voorzien is, sluit uitstekend op deze ontwikkelingen aan, omdat een combinatie van kennis van verschillende harde en zachte β -vakken een uitstekende basis vormt voor hedendaags levenswetenschappelijk onderzoek, met als een van de exponenten het genomics onderzoek.